

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 【発行国】 日本国特許庁 (J P)	(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)
(12) 【公報種別】 公開特許公報 (A)	(12) [Kind of Document] Japan Unexamined Patent Publication (A)
(11) 【公開番号】 特開平 1 0 - 2 4 8 5 7 8	(11) [Publication Number of Unexamined Application (A)] Japan Unexamined Patent Publication Hei 10-248578
(43) 【公開日】 平成 1 0 年 (1 9 9 8) 9 月 2 2 日	(43) [Publication Date of Unexamined Application] 1998 (1998) September 22 day
(54) 【発明の名称】 ロドコッカス属細菌用発現ベクター	(54) [Title of Invention] EXPRESSION VECTOR FOR RHODOCOCCLUS SP. BACTERIA
(51) 【国際特許分類第 6 版】	(51) [International Patent Classification 6th Edition]
C12N 15/09 ZNA	C12N 15/09 ZNA
C07H 21/04	C07H 21/04
C12N 1/21	C12N 1/21
// (C12N 15/09 ZNA	// (C12N 15/09 ZNA
C12R 1:01)	C12R 1:01)
(C12N 1/21	(C12N 1/21
C12R 1:01)	C12R 1:01)
【 F I 】	[FI]
C12N 15/00 ZNA A	C12N 15/00 ZNA A
C07H 21/04 B	C07H 21/04 B
C12N 1/21	C12N 1/21
【審査請求】 未請求	[Request for Examination] Examination not requested
【請求項の数】 7	[Number of Claims] 7
【出願形態】 F D	[Form of Application] FD
【全頁数】 1 0	[Number of Pages in Document] 10
(21) 【出願番号】 特願平 9 - 6 5 6 1 8	(21) [Application Number] Japan Patent Application Hei 9-65618
(22) 【出願日】 平成 9 年 (1 9 9 7) 3 月 5 日	(22) [Application Date] 1997 (1997) March 5 day
(71) 【出願人】	(71) [Applicant]
【識別番号】 0 0 0 0 0 3 9 5 3	[Applicant Code] 000003953
【氏名又は名称】 日東化学工業株式会社	[Name] NITTO CHEMICAL INDUSTRY CO. LTD. (DB 69-102-4137)
【住所又は居所】 東京都千代田区丸の内 1 丁目 5 番 1 号	[Address] Tokyo Chiyoda-ku Marunouchi 1-5-1

(72) 【発明者】

【氏名】 水村 由利江

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 日東化学工業株式会社中央研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 湯 不二夫

【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 日東化学工業株式会社中央研究所内

(57) 【要約】

【解決手段】 ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードする DNA 領域、該調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーター DNA 領域、ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能な DNA 領域およびロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性 DNA 領域を含んでなるロドコッカス属細菌用発現ベクター。

【効果】 ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属細菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記 (1)～(4) の DNA 領域を含んでなるロドコッカス (Rhodococcus) 属細菌用発現ベクター。

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードする DNA 領域

(2) (1) の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーター DNA 領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能な DNA 領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性 DNA 領域

【請求項 2】 調節因子が配列番号 1 のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号 2 のアミノ酸配列を有するポリペプチドの 2 成分より構成される請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 3】 ポリペプチドをコードする遺伝子が配列番号 3

(72) [Inventor]

[Name] Mizumura Yuri river

[Address] Inside of Kanagawa Prefecture Yokohama City Tsurumi-ku Daikoku-cho 10-1 Nitto Chemical Industry Co. Ltd. (DB 69-102-4137) Central Research Laboratory

(72) [Inventor]

[Name] Hot water Fujio

(57) [Abstract]

[Means of Solution] Including drug resistance DNA region which functions in growable DNA region and Rhodococcus sp. bacteria with the nitrilase gene promoter DNA region, and Rhodococcus sp. bacteria intracellular which receive activation with DNA region and the said regulating factor which code it does regulating factor which has action activating nitrilase gene promoter expression vector for Rhodococcus sp. bacteria which becomes.

[Effect(s)] Exogenote is installed in expression vector for Rhodococcus sp. bacteria and revealing the exogenote is made constitute possible by coexisting inside Rhodococcus sp. cell mass.

[Claim(s)]

[Claim 1] Including DNA region of below-mentioned (1) to (4), expression vector for the Rhodococcus (Rhodococcus) being attached bacteria which becomes.

(1) Regulating factor which has action which activates nitrilase gene promoter code is done DNA region

(2) (1) Activation is received with regulating factor nitrilase gene promoter DNA region

(3) With Rhodococcus sp. bacteria intracellular growable DNA region

(4) It functions in Rhodococcus sp. bacteria chemical resistance DNA region

[Claim 2] Expression vector which is stated in Claim 1 which from 2 component of the polypeptide which possesses amino acid sequence of polypeptide and Sequence Number 2 where the regulating factor has amino acid sequence of Sequence Number 1 is formed.

[Claim 3] Expression vector which is stated in Claim

および配列番号 4 の塩基配列を有する請求項 2 記載の発現ベクター。

【請求項 4】 ロドコッカス属細菌細胞内で複製増殖可能な DNA 領域がプラスミド pRC001、pRC002、pRC003 および pRC004 からなる群から選ばれる少なくとも 1 種のプラスミド由来である請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 5】 薬剤耐性 DNA 領域がトランスポゾン TN903 由来のカナマイシン耐性遺伝子からなる請求項 1 記載の発現ベクター。

【請求項 6】 請求項 1～5 に記載の発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は構成的に外来遺伝子の発現を可能とするロドコッカス (Rhodococcus) 属細菌用発現ベクターに関する。詳しくは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードする DNA 領域、調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーター DNA 領域、ロドコッカス属細菌内で複製可能な DNA 領域および薬剤耐性遺伝子を含む DNA 領域を含有する発現ベクター、ならびにこの発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物に関する。

【0002】

【従来の技術】ロドコッカス属に属する微生物は、その物理的強度や酵素等を細胞内に多量蓄積する能力から、産業的に有用な微生物触媒として知られ、例えば、ニトリル類の酵素的水和または加水分解によるアミドまたは酸の生産等に利用されている (特開平 2-470、特開平 3-251192 参照)。また、これらの酵素を含む微生物触媒を、遺伝子組換えの方法によりさらに有用なものに改良する試みがなされている (特開平 4-211379、特開平 6-25296、特開平 6-303971 参照)。さらに、ロドコッカス属に属する微生物の遺伝子操作を効率的に押し進めるために、宿主ベクター系の開発が進められており、新規なプラスミドの探索 (特開平 4-148685、特開平 4-330287、特開平 7-255484、特開平 参照) やベクターの開発 (特開平 5-64589、特開平 8-56669、Journal of Bacteriology 170, 638-645 (1988)、米

2 where gene which polypeptide the code is done has base sequence of Sequence Number 3 and Sequence Number 4.

[Claim 4] Expression vector which is stated in Claim 1 which is a plasmid derivation of the at least 1 kind which is chosen from group where duplication growable DNA region consists of plasmid pRC001, pRC002, pRC003 and pRC004 with the Rhodococcus sp. bacteria intracellular.

[Claim 5] Expression vector which is stated in Claim 1 where chemical resistance DNA region consists of the kanamycin resistance gene of transposons TN903 derivation.

[Claim 6] Recombinant plasmid which installs nitrile hydratase gene in expression vector which is stated in the Claims 1 through 5.

[Claim 7] With recombinant plasmid which is stated in Claim 6 neoplastic transformation microorganism which belongs to Rhodococcus sp. which is done.

[Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of Invention] This invention regards expression vector for Rhodococcus (Rhodococcus) being attached bacteria which makes revealing exogenous possible constitute. Details regard microorganism which belongs to Rhodococcus sp. which neoplastic transformation is done with plasmid which installs nitrile hydratase gene in expression vector, and this expression vector which contains DNA region which includes replicatable DNA region and chemical resistance gene inside nitrilase gene promoter DNA region and Rhodococcus sp. bacteria which receive activation with DNA region and regulating factor which regulating factor which has action which activates the nitrilase gene promoter code are done.

[0002]

[Prior Art] Microorganism which belongs to Rhodococcus sp., from capacity which in the intracellular large amount is accumulated, is informed physical strength and enzyme etc in industrial as useful microorganism catalyst, is utilized in production etc of the amide or acid by enzymatic hydration or hydrolysis of for example nitriles, (Japan Unexamined Patent Publication Hei 2-470 and Japan Unexamined Patent Publication Hei 3-251192 reference). In addition, furthermore attempt which improves to useful ones has done microorganism catalyst which includes these enzyme, with method of the gene recombination, (Japan Unexamined Patent Publication Hei 4-211379,

国特許 4,920,054) などが行われている。

【0003】本発明者らは、すでにロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株からニトリラーゼ遺伝子およびその調節遺伝子をクローン化し、複合プラスミドベクターpK4を用いてロドコッカス属体内での発現を可能とした(特開平8-173169参照)。さらに、ニトリラーゼ発現の構成化した変異株SK92-B1株の構成化に関わる変異調節因子をコードする遺伝子を誘導型ニトリラーゼ産生細菌内に導入することにより、誘導物質を添加することなくニトリラーゼを得ることを可能にした(特開平9-23832号公報参照)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これまでロドコッカス属の汎用的な発現ベクターは知られておらず、遺伝子を高発現させるのための新しいベクターの開発が望まれていた。

【0005】

【課題を解決するための手段】かかる状況下、鋭意検討を行った結果、本発明者らは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを構成的に活性化作用を有する変異型調節因子を含む汎用的で且つ目的とする遺伝子を高発現させ得るロドコッカス細菌用発現ベクターを見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は、

1) 下記(1)~(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス(*Rhodococcus*)属細菌用発現ベクター、

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

Japan Unexamined Patent Publication Hei 6-25296 and Japan Unexamined Patent Publication Hei 6-303971 reference). Furthermore, in order to push genetic operation of microorganism which belongs to the *Rhodococcus* sp. in efficient, development of host-vector system is advanced, search of novel plasmid (Japan Unexamined Patent Publication Hei 4-148685, Japan Unexamined Patent Publication Hei 4-330287, Japan Unexamined Patent Publication Hei 7-255484 and Japan Unexamined Patent Publication Hei reference) and development (Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-64589, Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-56669, Journal of Bacteriology 170, 638-645 (1988) and U.S. Patent 4,920,054) etc of vector is done.

[0003] Already nitrilase gene and its regulator gene cloning it did these inventors, from the *Rhodococcus erythropolis* (*Rhodococcus erythropolis*) SK92 strain, it made revelation with *Rhodococcus* sp. inside the body possible making use of the compound plasmid vector pK4, (Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-173169 reference). Furthermore, it made that nitrilase is obtained without adding the inducing substance by introducing gene which mutation regulating factor which relates to the constitution conversion of mutant SK92-B1 strain which it constitutes converts of nitrilase revelation code is done into inducible type nitrilase production bacteria, possible (Japan Unexamined Patent Publication Hei 9-23832 disclosure reference).

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention] But, common expression vector of *Rhodococcus* sp. was not known so far, high reveals for the sake of development of new vector was desired gene.

[0005]

[Means to Solve the Problems] Under this status, as for result of doing diligent investigation, as for these inventors, and gene which is made object high you discovered the expression vector for *Rhodococcus* bacteria which can be revealed with common which includes mutant type regulating factor which possesses action which activates the nitrilase gene promoter constitute this invention reached to completion.

[0006] As for namely, this invention,

1) including DNA region of below-mentioned (1) to (4), expression vector for *Rhodococcus* (*Rhodococcus*) being attached bacteria which becomes,

(1) Regulating factor which has action which activates nitrilase gene promoter code is done DNA region

(2) (1) の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

2) 上記発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド、ならびに、

3) 上記組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物、に関する。

[0007]

【発明の実施の形態】以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本発明の調節因子はロドコッカスエリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株の変異株SK92-B1株由来のものであるが、SK92株由来の調節因子を用いることにより、誘導型の発現ベクターにすることができる。

【0008】SK92-B1株は *R. erythropolis* SK92-B1 (FERM P-14853)、SK92株は *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324) として、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その他、以下に説明するプラスミド等は以下のとおりである。すなわち、SK92株由来ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミドpSK106はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pSK106 (FERM P-14856)、SK92-B1株由来ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミドpBSK201はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pBSK201 (FERM P-14855)、複合プラスミドベクターpK4はこれを含有する形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pK4 (FERM BP-3731)、ロドコッカスロドクロウス J-1株のH型ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミドpNHJ10Hはこれを含有する形質転換体 TGI/pNHJ10H (FERM BP-2777)、プラスミドpSJ023は形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674/pSJ023 (FERM P-16108) として、同じく工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

[0009]

【実施例】以下、実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

(2) (1) Activation is received with regulating factor nitrilase gene promoter DNA region

(3) With *Rhodococcus* sp. bacteria intracellular growable DNA region

(4) It functions in *Rhodococcus* sp. bacteria chemical resistance DNA region

2) recombinant plasmid which installs nitrile hydratase gene in above-mentioned expression vector, and,

Microorganism which belongs to *Rhodococcus* sp. which neoplastic transformation is done, it regards 3) with above-mentioned recombinant plasmid.

[0007]

[Embodiment of Invention] Below, this invention is explained in detail. Furthermore, as for regulating factor of this invention it is something of mutant SK92-B1 strain derivation of *Rhodococcus erythropolis* (*Rhodococcus erythropolis*) SK92 strain it can make expression vector of inducible type, but by using regulating factor of SK92 strain derivation.

[0008] As for SK92-B1 strain as for *R. erythropolis* SK92-B1 (FERM P-14853) and SK92 strain deposit it is done in respective Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324). In addition, plasmid etc which is explained below is as follows. As for namely, SK92 strain derivative nitrilase gene and plasmid pSK106 which includes the regulator gene as for transformed host *E. coli* JM109/pSK106 (FERM P-14856), SK92-B1 strain derivative nitrilase gene and includes the regulator gene plasmid pBSK201 which contain this as for transformed host *E. coli* JM109/pBSK201 (FERM P-14855) and compound plasmid vector pK4 which contain this as for plasmid pNHJ10H which includes H-type nitrile hydratase gene of the transformed host *R. rhodochrous* ATCC 12674/pK4 (FERM BP-3731) and *Rhodococcus rhodochrous* J-1 strain which contain this as for transformed host TGI/pNHJ10H (FERM BP-2777) and the plasmid pSJ023 which contain this deposit it is done similarly in Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as transformed host *R. rhodochrous* ATCC12674/pSJ023 (FERM P-16108).

[0009]

[Working Example(s)] You explain in detail below, with Working Example. However, this invention is not something which is limited by these Working Example.

【0010】実施例 1

1) 調節遺伝子をコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

1-1) DNA断片の作製

SK92株由来のプラスミドpSK106の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域(約3 kb EcoRV断片)(特開平8-173169参照)を、SK92-B1株由来のプラスミドpBSK201の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域(約3 kb EcoRV断片)とを置き換えたプラスミドpBSK302(特開平9-23832 参照)を制限酵素SacIで切断後、7.3 kbのSacI断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10 μlのpBSK302に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素SacI 2 μlを加え37℃にて2時間反応させた。ベクターに用いたpUC118断片は次のように作製した。10 μlのpUC118に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水77 μl、制限酵素SacI 2 μlを加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈澱させた後乾燥して50 μlの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフオスタファーゼ(宝酒造株式会社) 1 μl、10倍濃度緩衝液10 μl、滅菌水39 μlを加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈澱を行い乾燥して滅菌水に溶解した。7.3 kb断片を含むDNA断片画分1 μlを、上記のように調製したSacI切断pUC118とライゲーションキット(宝酒造株式会社)を用いて4℃で一晩反応させることによりpUC118への挿入を行った。

【0011】1-2) 形質転換体の作製および組換え体DNAの選別

大腸菌JM109株をLB培地(1.0%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、0.5%NaCl) 1 mlに接種し37℃、5時間前培養し、この培養物100 μlをSOB培地50 ml(2%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgSO₄、1 mM MgCl₂)に加え、18℃で20時間培養した。遠心により集菌した後、冷13 ml TF溶液(20 mM PIPES-KOH (pH 6.0)、200 mM KCl、10 mM CaCl₂、40 mM MnCl₂)を1.3 ml加え、0℃で10分放置後、再度遠心した。上澄を除いた後、沈澱した大腸菌に冷TF溶液3.2 mlに懸濁し0.22 mlのジメチルスルホキシドを加え0℃で10分間放置した。こうして作製したコンピテントセル200 μlに工程1-1)で作製した組換え体プ

[0010] Working Example 1

1) includes gene which regulator gene code is done production of plasmid which

1-1) production of DNA fragment

Region (Approximately 3 kb EcoRV fragment) (Japan Unexamined Patent Publication Hei 8-173169 reference) which includes gene which regulator gene of plasmid pSK106 of SK92 strain derivation code is done, region which includes the gene which regulator gene of plasmid pBSK201 of SK92-B1 strain derivation code is done (Approximately 3 kb EcoRV fragment) with plasmid pBSK302 (Japan Unexamined Patent Publication Hei 9-23832 reference) which is replaced after cutting off, its separated SacI fragment of 7.3 kb with restriction enzyme SacI due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from gel and recovered. 2 hours it reacted with 37 °C vis-a-vis pBSK302 of 10 l, including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 78 l and restriction enzyme SacI 2 l. Following way it produced pUC118 fragment which is used for vector. Vis-a-vis pUC118 of 10 l after 2 hours reacting, after phenol treatment and ethanol precipitation drying with 37 °C including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 77 l and the restriction enzyme SacI 2 l it melted in sterile water of 50 l. Furthermore, after reacting it did phenol treatment and ethanol precipitation with the 65 °C alkali フォス tough あ-ぜ (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) 1 l, including 10 times concentration buffer 10 l and the sterile water 39 l and dried and melted in sterile water. DNA fragment fraction 1 l which includes 7.3 kb fragment, as description above making use of the SacI cutting pUC118 and ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) which are manufactured it inserted to pUC118 overnight by reacting with 4 °C.

[0011] 1-2) of transformed host and selection of recombinant DNA

Inoculation it did E. coli JM109 strain in LB culture medium (1.0% Bacto triptone, 0.5% Bacto yeast extract and 0.5% NaCl) 1 ml and 37 °C and the 5 hours preculture did, 20 hour it cultured with 18 °C this culture 100 l in addition to SOB culture medium 50 ml (2% Bacto triptone, 0.5% Bacto yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgSO₄ and 1 mM MgCl₂). microbe collection after doing, 13 ml it added cold 13 ml TF solution (20 mM PIPES-KOH (pH 6.0), 200 mM KCl, 10 mM CaCl₂ and 40 mM MnCl₂) with the centrifugation, after 10 min leaving, centrifugation did for second time with the 0 °C. After excluding supernatant, in E. coli which

ラスミドを含有する溶液（DNAライブラリー）を10 μ l 加え、0°Cで30分放置後、42°Cで30秒間ヒートショックを与え0°Cで2分間冷却後、SOC培地（SOB培地に20 mM グルコースを加えたもの）を0.8 ml 加え37°Cにて60分間振盪培養した。これを200 μ l ずつアンピシリン100 μ g/ml と1 mMのIPTG（イソプロピル- β -チオガラクトシド）と0.3 mMのX-gal（5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド）含有のLB寒天培地にまき、37°Cで培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて青色発色の有無により目的の組換え体の選択を行った。

was precipitated suspension it did in cold TF solution 3.2 ml and 10 min it left with 0 °C including dimethyl sulfoxide of 0.22 ml. In this way, step 1-1) solution (DNA library) which contains recombinant plasmid which is produced with 10 μ l was added to competent cell 200 μ l which is produced, with 0 °C after 30 min leaving, 30 second heat shock was given with the 42 °C and with 0 °C after 2 min cooling. SOC culture medium (Those which add 20 mM glucose to SOB culture medium) the 60 min shaking culture was done with 0.8 ml adding 37 °C. This each 200 μ l IPTG of ampicillin 100 μ g/ml and 1 mM (isopropyl - β -thio galactoside) with in the LB agar culture medium of X - gal (5 - bromo - 4-chloro - 3 - indolyl - β -D - galactopyranoside) content of 0.3 mM it cultured with the spread and 37 °C.

Concerning transformed host colony which is grown on agar culture medium it selected recombinant of objective with presence or absence of blue coloration.

【0012】1-3) 組換え体プラスミドの調製

工程 1-2) で選択した形質転換体を100 mlのLB培地にて37°Cで一晩培養し、集菌後、滅菌水により洗浄し、溶液I（2 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris \cdot HCl (pH 8.0) を5 ml、リゾチームを25 mg 加え、0°Cで30分間放置した。溶液II（1 N NaOH、5% SDS）を10 ml 加え0°Cで5分間放置し、溶液III（3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8) を7.5 ml 加え0°Cで30分間放置した。これを遠心し、その上澄みに50 mlのエタノールを加えさらに遠心し上清を取り除き5 mlの溶液IV（10 mM 酢酸ナトリウム、50 mM Tris \cdot HCl (pH 8.0) とリボヌクレアーゼA溶液（10 mg/ml）を2.5 μ l 加え室温で20分間放置した。これに12 mlのエタノールを加え遠心後沈殿したプラスミドを乾燥し滅菌水で溶解した。こうして得られたプラスミドをpBSK305と命名した。

【0012】1-3) manufacturing recombinant plasmid

Step 1-2) with LB culture medium of 100 ml overnight culture it did transformed host which is selected with 37 °C, it washed after the microbe collection, with sterile water, solution I (the 2 mM glucose, 10 mM EDTA and 25 mM Tris \cdot HCl (pH 8.0) the 25 mg added 5 ml and lysozyme, 30 min left with the 0 °C. solution II (1 N NaOH and 5 % SDS) 5 min was left with 10 ml adding 0 °C, solution III (the 3 M sodium acetate (pH 4.8) 30 min was left with 7.5 ml adding 0 °C. centrifugation it did this, furthermore centrifugation it did in supernatant including ethanol of 50 ml and removed supernatant and solution IV of 5 ml (the 20 min left 10 mM sodium acetate, 50 mM Tris \cdot HCl (pH 8.0) and ribonuclease A solution (10 mg/ml) with the 2.5 μ l adding room temperature. It dried plasmid which after centrifugation was precipitated including the ethanol of 12 ml in this and melted with sterile water. In this way, plasmid which is acquired pBSK305 it designated.

【0013】2) ニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流ヘニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域が導入された、ロドコッカス属において複製可能な組換え体プラスミドの作製

【0013】2) region which includes nitrile hydratase gene was introduced to the nitrilase gene promoter downstream, in Rhodococcus sp. production of replicatable recombinant plasmid

工程 1) で作製したプラスミドpBSK305のニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流にニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を導入し、さらに、ベクターをpK4 [FERM BP-3731:ロドコッカス属プラスミドpRC004と大腸菌ベクターpHSG299（トランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む）を連結させたもの（特開平5-64589、特開平5-68566 参照）]としたプラスミドを作製した。プラスミドpBSK305を制限酵素XbaIとEcoRIで切断後、7.3 kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10 μ lのpBSK3

Step 1) region which includes nitrile hydratase gene in nitrilase gene promoter downstream of the plasmid pBSK305 which is produced with was introduced, furthermore, the plasmid which designates vector as pK4 (those which connect FERM BP - 3731 : Rhodococcus sp. plasmid pRC004 and E. coli vector pHSG299 (kanamycin resistance gene of transposons TN903 derivation is included.) (Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-64589 and Japan Unexamined Patent Publication Hei 5-68566

05に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μ l、滅菌水76 μ l、制限酵素XbaIとEcoRIをそれぞれ2 μ lを加え37 $^{\circ}$ Cにて2時間反応させた。

【0014】ベクターに用いたpK4断片は次のように作製した。10 μ lのpK4に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10 μ l、滅菌水78 μ l、制限酵素EcoRI2 μ lを加え37 $^{\circ}$ Cで2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈澱させた後乾燥して50 μ lの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフォスタファーズ（宝酒造株式会社）1 μ l、10倍濃度緩衝液10 μ l、滅菌水39 μ lを加え65 $^{\circ}$ Cで反応後フェノール処理、エタノール沈澱を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

【0015】J-1株H型ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む6.0kb DNA断片がpUC19ベクターに組み込まれたプラスミドpNHJ10H（特開平4-211379、Biochim. Biophys. Acta 1129, 23-33(1991)参照）を制限酵素BamHIで、切断後セルフライゲーションしてプラスミドpFY702を作製した。これを制限酵素EcoRVで切断後、リンカーpXbaI（宝酒造株式会社）とライゲーションし、さらに制限酵素EcoRIで切断後ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む2.1kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。7.3kb断片1 μ lと、ニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む2.1kb断片1 μ lおよび、上記のXbaIとEcoRI切断pK41 μ lとをライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させることによりプラスミドpSJ002を作製した（図1）。

【0016】3) ロドコッカス属細菌の形質転換および形質転換体のニトリルヒドラーゼ活性

ロドコッカス ロドクロウス ATCC12674株の対数増殖期の細胞を遠心分離により集菌し、氷冷した滅菌水にて3回洗浄し、滅菌水に懸濁した。1 μ lのプラスミドpSJ002と菌体懸濁液10 μ lを混合し、氷冷した。チャンバーにDNAと菌体の混合液を入れ、遺伝子導入装置CET-200型（日本分光）により電場強度3.8kV/cm、パルス幅1ms、パルス回数20回で電気パルス処理を行った。電気パルス処理液を氷冷下10分間静置し、37 $^{\circ}$ Cで、10分間ヒートショックを行い、MYK培地（0.5%ポリペプトン、0.3%バクトモルトエキス、0.3%バクトイーストエキス、0.2%KH₂PO₄、0.2%K₂HPO₄（pH 7.0））500 μ l

reference)) was produced. plasmid pBSK305 after cutting off, it separated fragment of 7.3 kb with the restriction enzyme XbaI and EcoRI due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from gel and recovered. Vis-a-vis pBSK305 of 10 μ l, 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 μ l, sterile water 76 μ l, restriction enzyme XbaI and the EcoRI 2 hours it reacted respectively with 2 μ l adding 37 $^{\circ}$ C.

[0014] Following way it produced pK4 fragment which is used for vector. Vis-a-vis pK4 of 10 μ l after 2 hours reacting, after phenol treatment and ethanol precipitation drying with 37 $^{\circ}$ C including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 μ l, sterile water 78 μ l and the restriction enzyme EcoRI 2 μ l it melted in sterile water of 50 μ l. Furthermore, after reacting it did phenol treatment and ethanol precipitation with the 65 $^{\circ}$ C alkali phosphatase (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) 1 μ l, including 10 times concentration buffer 10 μ l and the sterile water 39 μ l and dried and melted in sterile water.

[0015] With restriction enzyme BamHI, after cutting off self ligation doing plasmid pNHJ10H (Japan Unexamined Patent Publication Hei 4-211379 and Biochimica et Biophysica Acta (0005-2728, BBBMBS) 1129, 23-33(1991) reference) where, 6.0 kb DNA fragment which includes J-1 strain H-type nitrile hydratase gene is installed in pUC19 vector it produced plasmid pFY702. This after cutting off, linker pXbaI (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) and ligation it did with restriction enzyme EcoRV, furthermore it separated fragment of 2.1 kb which after cutting off includes nitrile hydratase gene with restriction enzyme EcoRI due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from the gel and recovered. 2.1 kb fragment 1 μ l and above-mentioned XbaI and EcoRI cutting pK41 μ l which include 7.3 kb fragment 1 μ l and nitrile hydratase gene making use of ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) the plasmid pSJ002 was produced overnight by reacting with 4 $^{\circ}$ C (Figure 1).

[0016] 3) neoplastic transformation of Rhodococcus sp. bacteria and nitrile hydratase activity of transformed host

Microbe collection it did cell of logarithmic growth phase of Rhodococcus rhodochrous ATCC12674 strain with centrifugal separation, the 3 time it washed with sterile water which ice cooling is done, the suspension did in sterile water. It mixed plasmid pSJ002 and cell mass suspension 10 μ l of 1 μ l, ice cooling did. mixed solution of DNA and cell mass was inserted in chamber, the electric pulsing treatment was done with electric field strength 3.8 kV/cm, pulse width 1 ms and pulse number of times 20 time with the gene introduction equipment CET-200 type (Jasco Corp.

を加え、26℃、3時間振盪培養した後、75 μg/ml カナマイシン入りMYK寒天培地に塗布し26℃、3日間培養した。

【0017】こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体(ATCC12674/pSJ002)をMYK培地(50 μg/ml カナマイシン含有)10 mlに接種し、30℃で24時間前培養した。この培養物1 mlを培地100 ml(1.5% グルコース、0.1% バクトイーストエキス、1% グルタミン酸ナトリウム、0.05% KH₂PO₄、0.05% K₂HPO₄、0.05% 硫酸マグネシウム、0.01% 塩化コバルト、pH 7.2、50 μg/ml カナマイシン含有)に加え、30℃で60時間培養した。集菌後、この菌体を50 mMリン酸緩衝液(pH 7.7)に懸濁し、その一部を2.5% アクリロニトリルを含む同緩衝液中で10℃、10分反応させた。1N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高圧液体クロマトグラフィーを用いて測定した。その結果、ロドコッカス属細菌組換え体ATCC12674/pSJ002において、4.4 mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0018】4) プラスミドpSJ023の作製

pSJ002には、遺伝子発現に必要な領域がまだ多く残っているため、不要な領域を取り除いたプラスミドpSJ023を作製した。pSJ002を制限酵素EcoRIで部分分解後、さらにEcoRVで切断し末端平滑化処理をおこなった後、リンカーpEcoRI(宝酒造株式会社)とともにライゲーションを行い、プラスミドpSJ008を作製した。10 μlのpSJ002に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水79.5 μl、制限酵素EcoRI 0.5 μlを加え37℃にて1時間反応させ、エタノール沈澱させた後乾燥して10 μlの滅菌水に溶解した。さらにKlenow Fragment(宝酒造株式会社)2 μl、10倍濃度緩衝液10 μl、滅菌水78 μlを加え37℃で反応後フェノール処理、エタノール沈澱を行い乾燥して滅菌水10 μlに溶解した。14.6 kbのDNA断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。回収したDNA断片10 μlに対し10倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素EcoRV 2 μlを加え、2時間反応させ、フェノール処理、エタノール沈澱を行った。次に、ライゲーションキット(宝酒造株式会社)を用いて、リンカーpEcoRI(宝酒造株式会社)と4℃で一晩反応させた。この溶液で形質転換された大腸菌よりプラスミドpSJ008を得た。

(DB 69-115-0700)) . under ice cooling 10 min standing it did electric pulsing treatment liquid, with 37 °C, did 10 min heat shock, 26 °C and 3 hours shaking culture after doing, it applied to 75 g/ml kanamycin entering MYK agar culture medium including MYK culture medium (0.5 % polypeptone , 0.3 % Bacto mole jp7 extract , 0.3 % Bacto yeast extract , 0.2 % KH₂ PO₄ and 0.2 % K₂ HPO₄ (pH 7.0)) 50 cultured.

[0017] In this way, inoculation it did *Rhodococcus* sp. bacteria recombinant (ATCC12674/pSJ002) which is produced in MYK culture medium (50 g/ml kanamycin content) 10 ml, 24 hours preculture did with 30 °C. This culture 1 ml in addition to culture medium 100 ml (1.5 % glucose , 0.1 % Bacto yeast extract , 1 % sodium glutamate , 0.05 % KH₂ PO₄ , 0.05 % K₂ HPO₄ , 0.05 % magnesium sulfate , 0.01 % cobalt chloride , pH 7.2 and 50 g/ml kanamycin content), 60 hour it cultured with the 30 °C. After microbe collection, suspension it did this cell mass in 50 mM phosphate buffer (pH 7.7), the part of that 10 °C and 10 min it reacted in same buffer which contains 2.5 % acrylonitrile. Reaction was stopped with addition of 1N hydrochloric acid, formation acrylamide in reaction mixture was measured making use of high-performance liquid chromatography. As a result, it could recognize formation of acrylamide of the 4.4 mM in *Rhodococcus* sp. bacteria recombinant ATCC12674/pSJ002.

[0018] 4) production of plasmid pSJ023

Because region where there is not a necessity for gene expression remains still mainly, plasmid pSJ023 which removes unnecessary region was produced in the pSJ002. pSJ002 with restriction enzyme EcoRI after partial hydrolysis, furthermore was cut off with the EcoRV and after doing end smoothing treatment, with linker pEcoRI (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) ligation was done, plasmid pSJ008 was produced. 1 hour reacting with 37 °C vis-a-vis pSJ002 of 10 l, including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 79.5 l and restriction enzyme EcoRI 0.5 l, after ethanol precipitation drying, it melted in sterile water of 10 l. Furthermore after reacting it did phenol treatment and ethanol precipitation with the 37 °C including Klenow Fragment (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) 2 l, 10 times concentration buffer 10 l and sterile water 78 l and dried and melted in sterile water 10 l. It separated DNA fragment of 14.6 kb due to 0.7 % agarose electrophoresis, cut from the gel and recovered. 2 hours reacting including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 78 l and restriction enzyme EcoRV 2 l the vis-a-vis DNA fragment 10 l which recovers, it did

【0019】また、プラスミド pBSK302 から調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域、約 3 kb EcoRV 断片を、0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。制限酵素による切断は、10 μ l の pBSK302 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μ l、滅菌水 78 μ l、制限酵素 EcoRV 2 μ l を加え 37°C にて 2 時間反応させることにより行った。この 3 kb EcoRV 断片 1 μ l を、EcoRI で切断した pUC118 とライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4°C で一晩反応させることにより pUC118 への挿入を行い、pBSK202 を作製した。プラスミド pBSK202 を制限酵素 EcoRI で切断後、3 kb 断片を 0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。

【0020】次に、プラスミド pSJ008 を制限酵素 EcoRI で部分分解後、さらにアルカリフォスファターゼ（宝酒造株式会社）で BAP 処理を行い、8.72 kb 断片を 0.7% アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。これと pBSK202 由来の 3 kb EcoRI 断片とをライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4°C で一晩反応させることにより、プラスミド pSJ023 を作製した（図 2）。

【0021】5) プラスミド pSJ023 を含むロドコッカス属細菌形質転換体のニトリルヒドラーゼ活性

工程 3) と同様にして、プラスミド pSJ023 のロドコッカス ロドクロウス ATCC12674 への導入を行い組み換え体（ATCC12674/pSJ023）を作製した。こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体を MYK 培地（50 μ g/ml カナマイシン含有）10 ml に接種し、30°C で 24 時間前培養した。この培養物 1 ml を培地 100 ml（1.5% グルコース、0.1% バクトイーストエキス、1% グルタミン酸ナトリウム、0.05% KH_2PO_4 、0.05% K_2HPO_4 、0.05% 硫酸マグネシウム、0.01% 塩化コバルト、pH 7.2、50 μ g/ml カナマイシン含有）に加え、30°C で 60 時間培養した。集菌後、この菌体を 50 mM リン酸緩衝液（pH 7.7）に懸濁し、その一部を 2.5% アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で 10°C、10 分反応させた。1 N 塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ 40 mM のアクリルアミドの生成が認められた。

phenol treatment and the ethanol precipitation. Next, overnight it reacted with linker pEcoRI (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) and 4°C making use of the ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK). With this solution plasmid pSJ008 was acquired from E. coli which neoplastic transformation is done.

[0019] In addition, from plasmid pBSK302 region and approximately 3 kb EcoRV fragment which include gene which regulator gene code is done, it separated due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from gel and recovered. It did cutting with restriction enzyme, 2 hours by reacting with the 37°C vis-a-vis pBSK302 of 10 l, including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 78 l and restriction enzyme EcoRV 2 l. Making use of pUC118 and ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK) which cut off this 3 kb EcoRV fragment 1 l, with the EcoRI it inserted to pUC118 overnight by reacting with the 4°C, produced pBSK202. plasmid pBSK202 after cutting off, it separated 3 kb fragment with restriction enzyme EcoRI due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from gel and recovered.

[0020] Next, plasmid pSJ008 with restriction enzyme EcoRI after partial hydrolysis, furthermore it treated BAP with alkali フォス tough あ-ぜ (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK), it separated 8.72 kb fragment due to 0.7% agarose electrophoresis, cut from gel and recovered. plasmid pSJ023 was produced overnight by reacting with 4°C this and the 3 kb EcoRI fragment of pBSK202 derivation making use of ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK), (Figure 2).

[0021] 5) includes plasmid pSJ023 nitrile hydratase activity of Rhodococcus sp. bacteria transformed host which

Step 3) to similar to, it introduced to ロド coca つす rhodochrous ATCC12674 of plasmid pSJ023 and rearranged and produced body (ATCC12674/pSJ023). In this way, inoculation it did Rhodococcus sp. bacteria recombinant which is produced in MYK culture medium (50 μ g/ml kanamycin content) 10 ml, 24 hours preculture did with 30°C. This culture 1 ml in addition to culture medium 100 ml (1.5% glucose, 0.1% Bacto yeast extract, 1% sodium glutamate, 0.05% KH_2PO_4 , 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% magnesium sulfate, 0.01% cobalt chloride, pH 7.2 and 50 μ g/ml kanamycin content), 60 hour it cultured with the 30°C. After microbe collection, suspension it did this cell mass in 50 mM phosphate buffer (pH 7.7), the part of that 10°C and 10 min it reacted in same buffer which contains 2.5% acrylonitrile. It stopped reaction with addition of 1N hydrochloric acid, when formation acrylamide in

【0022】6) ロドコッカス属細菌用発現ベクターの作製

工程 4) で作製したプラスミド pSJ023 からニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む領域を取り除くことにより汎用的な発現ベクターを作製した。10 μ l の pSJ023 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液 10 μ l、滅菌水 78 μ l、制限酵素 XbaI 2 μ l を加え 37°C にて 2 時間反応させた。その後ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて 4°C で一晩反応させた。次に、工程 1-2) 同様大腸菌 JM109 のコンピテントセルを作製し、この反応液を 10 μ l 加え、0°C で 30 分放置した。その後、42°C で 30 秒間ヒートショックを与え 0°C で 2 分間冷却後、SOC 培地を 0.8 ml 加え 37°C にて 60 分間振盪培養した。これを 200 μ l ずつカナマイシン 100 μ g/ml 含有の LB 寒天培地にまき、37°C で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて工程 1-3) 同様プラスミドの調製を行った。こうして得られたプラスミドを pRY01 と命名し、ロドコッカス属発現ベクターとした。

【0023】

【発明の効果】ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：244

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名：SK92-B1

配列：

reaction mixture was measured making use of high-performance liquid chromatography it could recognize formation of acrylamide of 40 mM.

[0022] 6) production of expression vector for Rhodococcus sp. bacteria

Common expression vector was produced step 4) by removing region which includes the nitrile hydratase gene from plasmid pSJ023 which is produced with . 2 hours it reacted with 37°C vis-a-vis pSJ023 of 10 l, including 10 times concentration restriction enzyme buffer 10 l, sterile water 78 l and restriction enzyme XbaI 2 l. overnight it reacted with 4°C after that making use of the ligation kit (Takara Shuzo Co. Ltd. (DB 69-053-7063) KK). Next, step 1-2) it produced competent cell of similar E. coli JM109, the 10 l added this reaction mixture, 30 min left with 0°C. after that, 30 second heat shock was given with 42°C and with the 0°C after 2 min cooling, SOC culture medium 60-minute shaking culture was done with 0.8 ml adding 37°C. This each 200 l in LB agar culture medium of kanamycin 100 g/ml content it cultured with the spread and 37°C. step 1-3) it manufactured similar plasmid concerning the transformed host colony which is grown on agar culture medium. In this way, plasmid which is acquired pRY01 it designated, made the Rhodococcus sp. expression vector.

[0023]

[Effects of the Invention] Exogenote is installed in expression vector for Rhodococcus sp. bacteria and revealing the exogenote is made constitute possible by coexisting inside Rhodococcus sp. cell mass.

[0024]

< sequence table >

Sequence Number : 1

Length of sequence : 244

Form of sequence : Amino acid

Topology : Straight chain

Kind of sequence : Protein

Origin

Organism name : Rhodococcus erythropolis (Rhodococcus erythropolis)

Strain name : SK92 - B1

Arrangement :

15	MetAlaGlyAlaAspValHisAlaGlnGlyGlyThrAsnArgArg	Met Ala Gly Ala Asp ValHis Ala Gln Gly Gly Thr Asn ArgArg 15
30	AlaArgIleLeuValValAspAspGluLysHisValArgThrMet	Ala Arg Ile LeuValVal Asp Asp Glu LysHisValArg Thr Met 30
45	ValThrTrpGlnLeuGluSerGluAsnPheAspValValAlaAla	Val Thr Trp Gln Leu Glu Ser GluAsn Phe Asp Val Val Ala Ala 45
60	AlaAspGlyAspAlaAlaLeuArgGlnValThrGluSerAlaPro	Ala Asp Gly Asp Ala Ala LeuArg Gln Val Thr Glu Ser Ala Pro 60
75	AspLeuMetValLeuAspLeuSerLeuProGlyLysGlyGlyLeu	Asp LeuMet ValLeu Asp Leu Ser Leu Pro Gly Lys Gly Gly Leu 75
90	GluValLeuAlaThrValArgArgThrAspAlaLeuProIleVal	Glu ValLeu Ala Thr ValArgArg Thr Asp Ala Leu P ro Ile Val 90
105	ValLeuThrAlaArgArgAspGluThrGluArgIleValAlaLeu	ValLeu Thr Ala ArgArg Asp Glu Thr GluArg Ile V al Ala Leu 105
120	AspLeuGlyAlaAspAspTyrValIleLysProPheSerProArg	Asp Leu Gly Ala Asp Asp TyrVal Ile Lys Pro Phe Ser Pro Arg 120
135	GluLeuAlaAlaArgIleArgAlaValLeuArgArgThrThrAla	Glu Leu Ala Ala Arg Ile Arg Ala ValLeuArgArg Th r Thr Ala 135
150	GluProProHisGluAlaAlaValGlnArgPheGlyAspLeuGlu	Glu Pro Pro His GluAla Ala Val Gln Arg Phe Gly Asp Leu Glu 150
165	IleAspThrAlaAlaArgGluValArgLeuHisGlyIleProLeu	Ile Asp Thr Ala Ala Arg Glu ValArgLeuHis Gly Ile Pro Leu 165
180	GluPheThrThrLysGluPheAspLeuLeuAlaTyrMetAlaAla	Glu Phe Thr Thr Lys Glu Phe Asp LeuLeu Ala Tyr Met Ala Ala 180
195	SerProMetGlnValPheSerArgArgArgLeuLeuLeuGluVal	Ser Pro Met Gln Val Phe Ser ArgArgArgLeuLeuLe u Glu Val 195
210	TrpArgSerSerProAspTrpGlnGlnAspAlaThrValThrGlu	TrpArg Ser Ser Pro Asp Trp Gln Gln Asp Ala Thr Val Thr Glu 210
225	HisValHisArgIleArgArgLysIleGluGluAspProThrLys	HisValHisArg Ile ArgArgLys Ile Glu GluAsp Pro Thr Lys 225
240	ProThrIleLeuGlnThrValArgGlyAlaGlyTyrArgPheAsp	Pro Thr Ile Leu Gln Thr ValArg Gly Ala Gly TyrAr g Phe Asp 240
244	GlyGluArgAla	Gly GluArg Ala 244

【0025】配列番号：2

[0025] Sequence Number : 2

配列の長さ：534

Length of sequence : 534

配列の型：アミノ酸

Form of sequence : Amino acid

トポロジー：直鎖状

Topology : Straight chain

配列の種類 : タンパク質

起源

生物名 : ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名 : SK92-B1

配列 :

15 MetMetThrAspThrLeuProSerSerSerArgTrpThrLeuGlu

30 GlyProHisLeuGlnProLeuGlnGlyGluAlaLeuAlaAspLeu

45 HisAlaArgThrLeuGluMetIleThrSerGlyArgGluLeuHis

60 GluThrLeuGluValValAlaArgGlyIleGluGluLeuMetPro

75 GlyLysArgCysAlaIleLeuLeuLeuAspAsnThrGlyProVal

90 LeuArgCysGlyAlaAlaProThrMetSerAlaProTrpArgArg

105 TrpIleAspSerLeuValProGlyProMetSerGlyGlyCysGly

120 ThrAlaValHisLeuGlyGluProValIleSerTyrAspValAla

135 AspAspProLysPheArgGlyProPheArgAlaAlaAlaLeuHis

150 GluGlyIleArgAlaCysTrpSerThrProValThrSerGlyAsp

165 GlyThrIleLeuGlyThrPheAlaIleTyrGlySerValProAla

180 PheProAlaGlnGlnAspValAlaLeuValThrGlnCysThrAsp

195 LeuThrAlaAlaValIleThrThrHisLysLeuHisGlnAspLeu

210 SerMetSerGluGluArgPheArgArgThrPheAspSerAsnVal

225 ValGlyMetAlaLeuLeuAspGluSerGlySerSerIleArgVal

240 AsnAspThrLeuCysAlaLeuThrAlaAlaProProArgArgLeu

255 LeuGlyHisProMetGlnGluIleLeuThrAlaAspSerArgGlu

Kind of sequence : Protein

Origin

Organism name : Rhodococcus erythropolis (Rhodococcus erythropolis)

Strain name : SK92 - B1

Arrangement :

MetMet Thr Asp Thr Leu Pro Ser Ser Ser ArgTrp Thr Leu Glu 15

Gly Pro HisLeu Gln Pro Leu Gln Gly GluAlaLeu Ala Asp Leu 30

His Ala Arg Thr Leu Glu Met Ile Thr Ser Gly Arg Glu LeuHis 45

Glu Thr Leu Glu ValVal Ala Arg Gly Ile Glu Glu LeuMet Pro 60

Gly LysArgCys Ala Ile LeuLeuLeu Asp Asn Thr GlyProVal 75

LeuArgCys Gly Ala Ala Pro Thr Met Ser Ala Pro TrpArgArg 90

TrpIle Asp Ser LeuVal Pro Gly Pro Met Ser Gly GlyCys Gly 105

Thr Ala ValHisLeu Gly Glu Pro Val Ile Ser Tyr AspValAla 120

Asp Asp Pro Lys Phe Arg Gly Pro Phe Arg Ala AlaAlaLeuHis 135

Glu Gly Ile Arg Ala CysTrp Ser Thr Pro Val Thr SerGlyAsp 150

Gly Thr Ile Leu Gly Thr Phe Ala Ile Tyr Gly Ser ValProAla 165

Phe Pro Ala Gln Gln Asp Val Ala LeuVal Thr Gln CysThrAsp 180

Leu Thr Ala Ala Val Ile Thr Thr HisLysLeuHis GlnAspLeu 195

Ser Met Ser Glu GluArg Phe ArgArg Thr Phe Asp SerAsnVal 210

Val Gly Met Ala LeuLeu Asp Glu Ser Gly Ser SerIleArgVal 225

Asn Asp Thr LeuCys Ala Leu Thr Ala AlaProProArgArgLeu 240

Leu Gly His Pro Met Gln Glu Ile Leu Thr Ala Asp SerArgGlu 255

270	ProPheAlaAsnGlnLeuSerSerIleArgGluGlyLeuThrAsp	Pro Phe Ala Asn Gln Leu Ser Ser Ile Arg Glu Gly Leu Thr Asp 270
285	GlyGlyGlnLeuAspGlyArgIleGlnThrThrGlyGlyArgTrp	Gly Gly Gln Leu Asp Gly Arg Ile Gln Thr Thr Gly Gly ArgTrp 285
300	IleProValHisLeuSerIleSerGlyMetTrpThrThrGluArg	Ile Pro ValHisLeu Ser Ile Ser Gly MetTrp Thr Thr G luArg 300
315	GluPheMetGlyPheSerValHisValLeuAspIleSerGluArg	Glu Phe Met Gly Phe Ser ValHisValLeu Asp Ile Se r GluArg 315
330	LeuAlaAlaGluArgAlaArgGluGluGlnLeuGluAlaGluVal	Leu Ala Ala GluA rg Ala Arg Glu Glu Gln Leu Gl uA la Glu Val 330
345	AlaArgHisThrAlaGluGluAlaSerArgAlaLysSerThrPhe	Ala ArgHis Thr Ala Glu GluA la Ser Arg Ala Lys S er Thr Phe 345
360	LeuSerGlyMetThrHisGluValGlnThrProMetAlaValIle	Leu Ser Gly Met Thr His Glu Val Gln Thr Pro Met Ala Val Ile 360
375	ValGlyPheSerGluLeuLeuGluThrLeuAspLeuAspGluGlu	Val Gly Phe Ser Glu LeuLeu Glu Thr Leu Asp Leu Asp Glu Glu 375
390	ArgArgGlnCysAlaTyrArgLysIleGlyGluAlaAlaLysHis	ArgArg Gln Cys Ala TyrArgLys Ile Gly GluA la A la LysHis 390
405	ValIleSerLeuValAspAspValLeuAspIleAlaLysIleGlu	Val Ile Ser LeuVal Asp Asp ValLeu Asp Ile Ala Ly s Ile Glu 405
420	AlaGlyAlaIleThrLeuGlnAspGluAspIleAspLeuSerGlu	Ala Gly Ala Ile Thr Leu Gln Asp GluA s pl le Asp Leu Ser Glu 420
435	GluValAlaThrIleValGluMetLeuGluProIleAlaArgAsp	Glu Val Ala Thr Ile Val Glu MetLeu Glu Pro Ile Al a Arg Asp 435
450	ArgAspArgAspValCysLeuArgTyrValProProGlnThrPro	Arg Asp Arg Asp ValCysLeuArgTyrVal Pro Pro G ln Thr Pro 450
465	ValHisValCysSerAspArgArgArgValArgGluValLeuLeu	ValHisValCys Ser Asp ArgArgArgValArg Glu Val LeuLeu 465
480	AsnIleValSerAsnGlyIleLysTyrAsnArgLeuGlyGlyVal	Asn Ile Val Ser Asn Gly Ile LysTyr Asn ArgLeu Gl y Gly Val 480
495	ValAspProProThrGlySerGlyAlaAlaArgProArgGlnThr	Val Asp Pro Pro Thr Gly Ser Gly Ala Ala Arg Pro Arg Gln Thr 495
510	ArgAlaProAspTyrProAlaThrProThrThrAsnSerSerSer	Arg Ala Pro Asp Tyr Pro Ala Thr Pro Thr Thr Asn Ser Ser Ser 510
525	ProSerThrGlyTrpGluSerArgProArgGlyCysLysGlyArg	Pro Ser Thr Gly Trp Glu Ser Arg Pro Arg Gly Cys Lys Gly Arg 525
534	GlySerValLeuArgSerProAlaArg	Gly Ser ValLeuArg Ser Pro Ala Arg 5 34

【0026】配列番号：3

[0026] Sequence Number : 3

配列の長さ : 735

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

起源

生物名 : ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名 : SK92-B1

配列 :

ATG GCC GGA GCG GAC GTC CAC GCC CAG GGT GGG ACG AAT CGA
CGT 45GCA CGC ATC CTC GTC GTC GAC GAC GAA AAA CAG GTG CGC ACG
ATG 90GTG ACG TGG GAA CTC GAA TCG CAG AAT TTG GAT GTT GTC GGT
GCG 135GCA GAC GGA GAT GCG GCA CTG CGT CAG GTC ACT GAG AGC GCA
CCC 180GAT TTG ATG GTG CTC GAT CTG TCG CTC CCG GGG AAA GGT GGG
TTG 225GAA GTG CTC GCT ACG GTC CGC AGA ACC GAT GCA CTG CCT ATC
GTC 270GTG CTC ACA GCA CGC CGC GAT GAA ACC GAA CGG ATC GTC GCG
CTG 315GAT CTC GGC GCC GAT GAC TAC GTC ATC AAA CCG TTC TCG CCG
CGG 360GAA TTG GCC GCC CGT ATC CGG GCA GTG CTT CGT CGA ACC ACA
GCT 405GAA CCC CCA CAC GAG GCG GCG GTT CAG CGA TTC GGT GAC CTA
GAG 450ATC GAC ACC GCT GCG CGC GAG GTT CGG CTC CAC GGG ATA CCG
CTC 495GAG TTC ACC ACC AAG GAG TTC GAT CTG CTG GCC TAT ATG GCC
GCA 540TCA CCG ATG CAG GTC TTC AGC CGA CGC AGA TTG TTG CTC GAG
GTG 585TGG CGA TCG TCG CCC GAC TGG CAG CAG GAC GCC ACC GTG ACC
GAG 630CAC GTG CAC CGC ATT CGC CGC AAG ATC GAA GAA GAT CCG ACC
AAA 675

Length of sequence : 735

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Double strand

Topology : Straight chain

Origin

Organism name : Rhodococcus erythropolis (Rhodococcus erythropolis)

Strain name : SK92 - B1

Arrangement :

ATG GCC GGA GCG GAC GT C CAC GCC CAG G
GT GGC ACG AAT CGA C GT 45GCA CGC ATC CT C GT C GT C GAC GAC GAA
AA ACA C GT G CGC ACG ATG 90GT G AC GT GG CAA CT C GAA TCG GAG AAT TT
C GAT GT T GT CGCT GCG 135GCA GAC GGA GAT GCG GCA CT G C GT CAG
GT C A CT GAG AGC GCA CCC 180GAT T TGA TG GT G CT C GA TCT GT CGCT C C
CG GGG AAA G GT GG GT TG 225GAA GT G CT CGCT ACG GT C CGC AGA ACC
GAT GCA CT G C CT ATC GT C 270GT G CT C ACA GCA CGC CGC GA TGA A ACC
GAA CGG ATC GT C G CGCT G 315GA TCT C GGC GCC GA TGA CT AC GT C ATC A
AA CC GT TCT CC CCG CGG 360GAA TTG GCC GCC C GTA TC CGG GCA GT G C
T T C GT CGA ACC ACA G CT 405GAA CCC CC ACA C GAG GCG GCG GT T CAG C
GA TTC G GT GAC CT A GAG 450ATC G ACA C CGCT GCG CGC GAG GT T CGG C
T C CAC GGG ATA C CGCT C 495GA GT TC ACC ACC AAG GA GT TC GA TCT G CT
G GC CT AT ATG GCC GCA 540TCA CCG ATG CAG GT CT TC AGC CGA CGC AG
A TT GT TG CT C GAG GT G 585TGG CGA TC GT CG CCC GA CT GG CAG CAG GA
C GCC ACC GT G ACC GAG 630CAC GT G CAC CGC ATT CGC CGC AAG ATC GA
A GAA GAT CCC ACC AAA 675

CCG ACG ATC CTG CAG ACA GTG CCG GGA GCC GGT TAC GGT TTC
GAC 720

GGA GAG CGT GCA TGA
735

【0027】配列番号：4

配列の長さ：1605

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*)

株名：SK92-B1

配列：

ATG ATG ACC GAC ACA CTG CCC TCC TCG TCC CGT TGG ACC CTT
GAA 45

GGC CCG CAT CTC CAG CCG CTG CAG GGT GAG GCC CTG GCG GAT
CTC 90

CAC GCC CGT ACG CTC GAG ATG ATC ACT TCC GGG AGA GAA TTG
CAC 135

GAG ACA CTC GAG GTG GTC GCG CCG GGC ATC GAG GAA CTG ATG
CCG 180

GGC AAA CGT TGC GCA ATT CTG TTG CTC GAC AAC ACC GGA CCG
GTA 225

TTG CGC TGC GGC GCG GCC CCA ACA ATG AGC GCG CCG TGG CCG
CGG 270

TGG ATC GAC AGC CTC GTC CCT GGT CCG ATG TCG GGT GGC TGC
GGC 315

ACA GCG GTT CAC CTC GGC GAG CCG GTT ATT TCC TAT GAC GTG
GCC 360

GAT GAC CCG AAA TTC CCG GGC CCC TTC CCG GCC GCA GCC CTC
CAC 405

GAG GGC ATA CGT GCC TGC TGG TCC ACC CCC GTC ACA AGC GGA
GAC 450

GGC ACG ATC CTC GGC ACT TTC GCG ATC TAC GGA TCC GTG CCG
GCG 495

TTC CCC GCA CAA CAG GAC GTT GCC CTG GTC ACC CAA TGC ACC
GAC 540

CCG ACG ATC CTG CAG ACA GTG CCG GGA
GCC GGT TAC C GT TTC GAC 720

GGA GAG C GT GCA TGA
735

[0027] Sequence Number : 4

Length of sequence : 1605

Form of sequence : Nucleic acid

Number of strands : Double strand

Topology : Straight chain

Origin

Organism name : *Rhodococcus erythropolis* (*Rhodococcus erythropolis*)

Strain name : SK92 - B1

Arrangement :

A TGA TGA CCG ACA CA CTG CCCTCCTCCTG
CCC GT TGG ACC CT TGA A 45

GGC CCG CA TCT C CAG C CGCT G CAG G GT G
AG GCC CT G GCG GA TCT C 90

CAC GCC C GTA CGCT C GAG A TGA TC A CT T
CC GGG AGA GAA TTG CAC 135

GAG ACA CT C GAG GT G GT C GCC CCG GGC
ATC GAG GAA CT G ATG CCG 180

GGC AAA C GT TGC GCA AT TCT GT TG CT C G
ACA ACA CC GGA CCG GTA 225

TTG CGCT GC GCG GCG GCC CCA ACA A TGA
GC GCG CC GT GG CCG CCG 270

TGG ATC G ACA GC CT C GT C C CT G GT CCG
AT GT CG G GT GG CT GC GGC 315

ACA GCG GT T CAC CT C GGC GAG CCG GT T
ATT TC CT A TGA C GT G GCC 360

GA TGA C CCG AAA TTC CCG GGC CC CT TC CG
C GCC GCA GCC CT C CAC 405

GAG GGC ATA C GT GC CT G CT G GT CC ACC C
CC GT C ACA AGC GGA GAC 450

GGC ACG ATC CT C GGC A CT TTC GCG A TCT
AC GGA TCC GT G CCG CCG 495

TTC CCC GC ACA ACA G GAC GT T GCC CT G
GT C ACC CAA TGC ACC GAC 540

CTG ACC GCT GCC GTC ATC ACC ACC CAC AAA CTT CAT CAA GAT CTG 585	CTG ACCGCT GCC GT C ATC ACC ACC C ACA AA CT T CAT CAA GA TCT G 585
AGC ATG AGC GAG GAG CGG TTC CGA CGC ACC TTC GAT TCC AAT GTC 630	AGC A TGA GC GAG GAG CG GT TC CGA CGC AC CT TC GAT TCC AAT GT C 630
GTC GGC ATG GCA CTT CTC GAC GAA TCC GGC TCC AGC ATC CGC GTC 675	GT C GGC ATG GCA CT TCT C GAC GAA TCC GG CT CC AGC ATC CGC GT C 675
AAC GAC ACC CTG TGC GCG TTG ACC GCA GCT CCG CCA CGG CGC CTC 720	AAC G ACA CC CT GT GC GC GT TGA CC GCA G CT CCG CCA CGG CGC CT C 720
CTC GGC CAC CCC ATG CAG GAG ATA CTC ACC GCC GAC TCC CGG GAA 765	CT C GGC CAC CCC ATG CAG GAG A TACT C AC C GCC GA CT CC CGG GAA 765
CGG TTC GCC AAT CAG TTG TCC TCC ATC CGT GAG GGA TTG ACC GAC 810	CC GT TC GCC AAT CA GT T GT C CT CC ATC C GT GAG GGA T TGA CC GAC 810
GGC GGA CAG CTC GAC GGA CGA ATC CAA ACC ACC GGA GGT CGG TGG 855	GGC GG ACA G CT C GAC GGA CGA ATC CAA A CC ACC GGA G GT CG GT GG 855
ATT CCG GTG CAC CTG TCC ATC AGC GGT ATG TGG ACC ACG GAG CGG 900	ATT CCG GT G CAC CT GT CC ATC AGC G GTA T GT GG ACC ACG GAG CGG 900
GAG TTC ATG GGA TTC AGC GTC CAT GTC CTG GAC ATC TCC GAG CGC 945	GA GT TC ATG GGA TTC AGC GT C CAT GT C C T G G ACA TCT CC GAG CGC 945
CTG GCC GCC GAA CGC GCC CGC GAG GAA CAA CTC GAG GCC GAG GTT 990	CT G GCC GCC GAA CGC GCC CGC GAG GA ACA A CT C GAG GCC GAG GT T 990
GCC CGC CAT ACC GCG GAG GAA GCC AGT CGC GCC AAG TCC ACG TTC 1035	GCC CGC CAT ACC GCG GAG GAA GCC A GT C GC GCC AA GT CC AC GT TC 1035
CTG TCC GGC ATG ACG CAC GAG GTC CAA ACG CCC ATG GCC GTT ATC 1080	CT GT CC GGC A TGA CG CAC GAG GT C CAA A CG CCC ATG GCC GT T ATC 1080
GTC GGA TTC AGT GAG CTA CTC GAG ACG CTG GAC CTG GAT GAA GAA 1125	GT C GGA TTC A GT GAG CT A CT C GAG A CG CT G GAC CT G GA TGA A GAA 1125
CGT CGT CAG TGC GCC TAC CGC AAG ATC GGC GAA GCC GCG AAA CAC 1170	C GT C GT CA GT GC GC CT AC CGC AAG ATC GGC GAA GCC GCG AA ACA C 1170
GTG ATC TCC CTG GTC GAC GAC GTT CTC GAT ATA GCC AAG ATC GAA 1215	GT G A TCT CC CT G GT C GAC GAC GT TCT C GAT ATA GCC AAG ATC GAA 1215
GCC GGC GCT ATC ACT CTG CAG GAC GAA GAC ATC GAC CTG TCC GAA 1260	GCC GG CGCT ATC A CT CT G CAG GAC GAA G ACA TC GAC CT GT CC GAA 1260
GAA GTT GCC ACC ATC GTG GAG ATG CTC GAG CCC ATC GCC CGT GAC 1305	GAA GT T GCC ACC ATC GT G GAG ATG CT C G AG CCC ATC GCC C GT GAC 1305
CGT GAC CGT GAC GTC TGC CTG CGG TAC GTC CCG CGG CAG ACA CCG 1350	C GT GAC C GT GAC GT CT GC CT G CG GTA C GT C CCG CCG CAG ACA CCG 1350
GTG CAC GTG TGC TCG GAC CGG CGG CGG GTG CGG GAA GTG CTG CTC 1395	GT G CAC GTGT G CT CG GAC CGG CGG CGG G T G CGG GAA GT G CT G CT C 1395
AAC ATC GTC TCC AAC GGG ATC AAG TAC AAT CGG CTC GGT GGT GTC 1440	A ACA TC GT CT CC AAC GGG ATC AA GTA C A AT CGG CT C G GT G GTGT C 1440

GTC GAC CCC CCA ACA GGA TCA GGG GCT GCT CGT CCG CGT CAG
ACG 1485

AGG GCC CCG GAC TAC CCA GCG ACG CCG ACG AAG TCT TCG
AGC 1530

CCT TCA ACC GGC TGG GAG TCG AGG CCA CGG GGG TGC AAG GGT
CGG 1575

GCC TCG GTC TTG CGC TCT CCC GCG CGC TGA
1605

[0028]

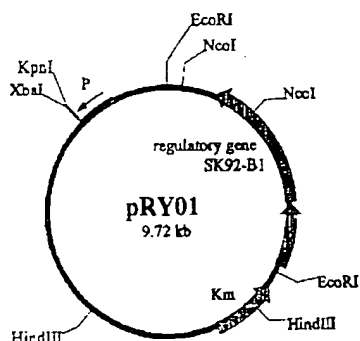
【図 3】の簡単な説明

【図 1】組換え体 pSJ002 の作製図

【図 2】組換え体 pSJ023 の作製図

【図 3】発現ベクター pRY01 の制限酵素地図

【図 3】



GT C GAC CCC CCA ACA GGA TCA GGG G CT
G CT C GT CCG C GT CAG ACG 1485

AGG GCC CCG GA CT AC CCA GCG ACG CCG AC
G ACG AA CT CT TCG AGC 1530

C CT TCA ACC GG CT GG GA GT CG AGG CCA C
GG GG GT GC AAG G GT CGG 1575

GG CT CG GT CT TG CGCT CT CCC GCG CGCT
GA 1605

[0028]

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

[Figure 1] Work graph making of recombinant pSJ002

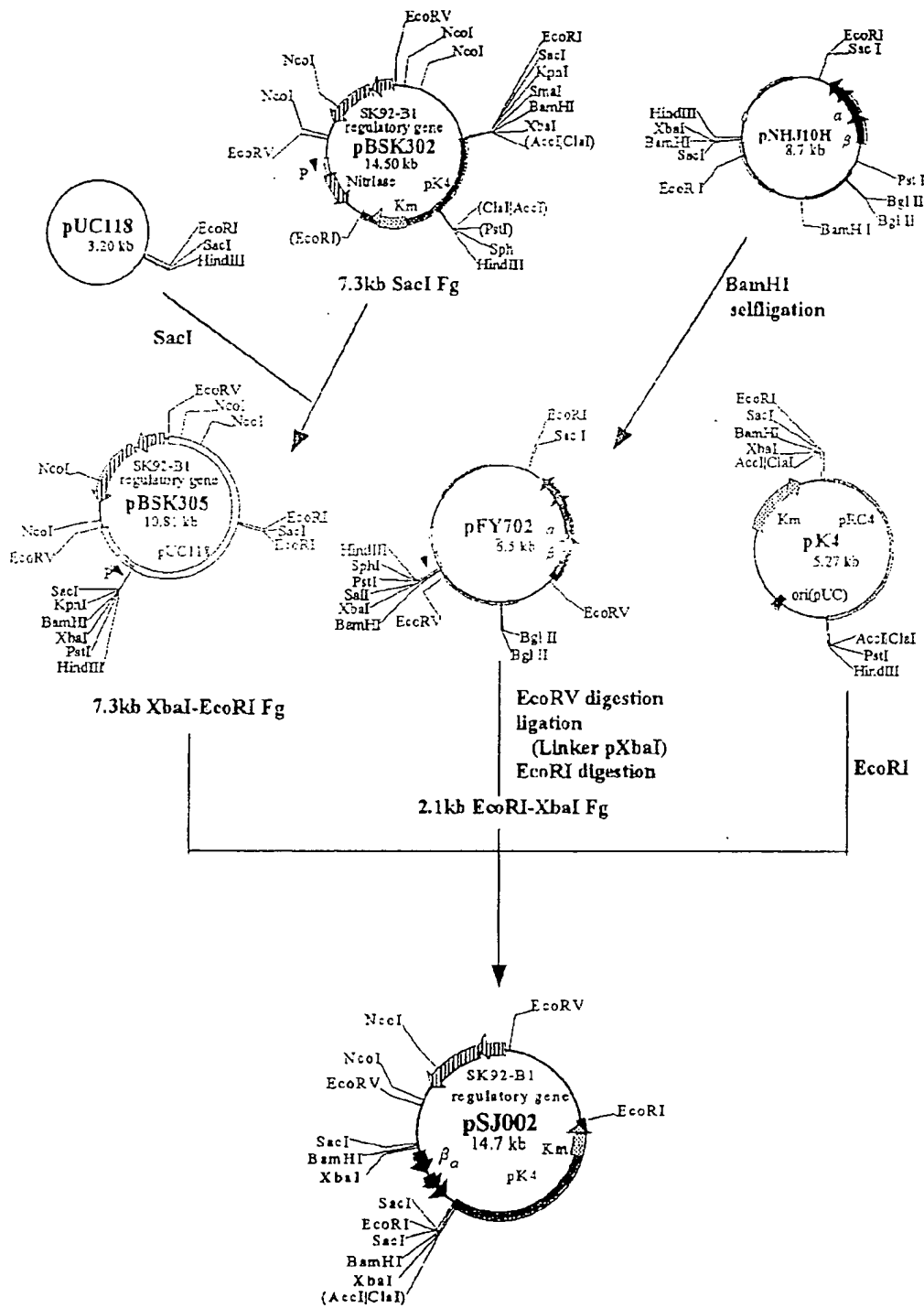
[Figure 2] Work graph making of recombinant pSJ023

[Figure 3] Restriction enzyme map of expression vector pRY01

[Figure 3]

【図 1】

[Figure 1]



[図 2]

[Figure 2]

